

(11) 特許出願公表番号

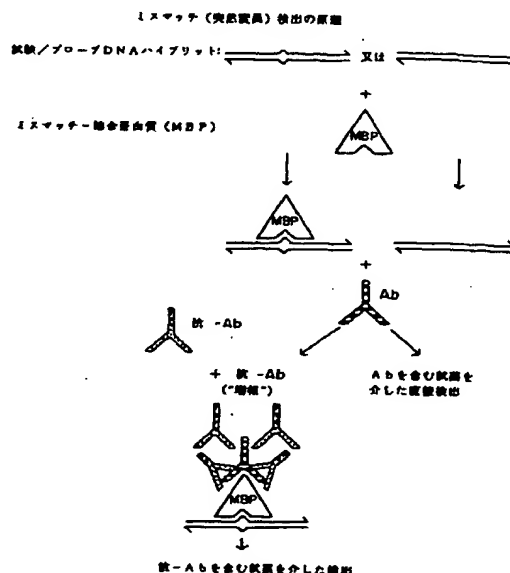
(43)公表日 平成7年(1995)1月19日

F I

審查請求 未請求 予備審查請求 有 (全 20 頁)

(71)出願人	アブステイト・バイオテクノロジー・インコーポレーテッド アメリカ合衆国ニューヨーク州12946レイクブラシド・サラナクアベニュー-89
(72)発明者	ワグナー、ロバート・イー、ジュニア アメリカ合衆国ニューヨーク州12989パーモントビル・ボツクス236・ルート1
(72)発明者	ラドマン、ミロ斯拉ブ フランス国75013パリ・アベニューデイタリ 139
(74)代理人	弁理士 小田島 平吉

1 個の塩基の変化又は約 1 - 4 塩基対の付加あるいは欠失などの突然変異の検出法は、Mut S などの DNA ミスマッチー結合蛋白質の利用に基づいており、その蛋白質は 1 個の塩基ミスマッチ又は不對塩基を有する核酸ハイブリッドに結合し、それによりヌクレオチド配列中に 1 個の塩基変化のような小さい変化を含む突然変異の検出を可能にする。そのような方法は多様な重要な疾患状態又は罹り易さの診断、例えば突然変異発癌遺伝子の存在の検出に有用である。本方法は PCR に基づく方法の効率に関する利点を共有するが、行うのもっと簡単で安価である。本発明の方法の実行に有用なキットも提示する。



請求の範囲

1. (a) 試料を、標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的な少なくとも1個の1本鎖塩基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共に、該ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得る該標的ポリヌクレオチドの突然変異又は非突然変異配列にハイブリッド形成をしてハイブリッドを形成するのに適した条件下でインキュベートし、

(b) 段階(a)で形成されたハイブリッドをミスマッチ-結合蛋白質と接触せしめ、

(c) 該ハイブリッドに結合したミスマッチ-結合蛋白質の存在を検出する段階を含み、それによりミスマッチ-結合蛋白質の存在の検出が試料のポリヌクレオチドの配列中の突然変異の存在の指標となることを特徴とする、試料中の1本鎖標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列から突然変異を検出する方法。

2. 該ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーがDNAであることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

3. 該ハイブリッド形成パートナーDNAがcDNAであることを特徴とする、請求の範囲2に記載の方法。

4. 該標的ポリヌクレオチドがDNAであることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

5. 該ミスマッチ-結合蛋白質がMusS蛋白質又はその機能の誘導体であることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

6. 該試料がその中に存在する核酸を放出し、変性させるのに十分な条件に会わせた生物学的試料又は液であることを特徴とする、請求の範囲

記載の方法。

16. 該第2蛋白質がペーターガラクトシダーゼであることを特徴とする、請求の範囲15に記載の方法。

17. 段階(b)の該ミスマッチ-結合蛋白質が検出可能な第2蛋白質又はペプチドと融合した融合蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

18. 該検出段階が該第2蛋白質又はペプチドに結合することができる第2結合パートナーの添加及び該第2結合パートナーの存在の検出を含むことを特徴とする、請求の範囲17に記載の方法。

19. 該第2蛋白質がペーターガラクトシダーゼであることを特徴とする、請求の範囲18に記載の方法。

20. 該第2蛋白質が色素原酵素基質からの着色反応生成物の形成を触媒することができる酵素であり、該検出段階が該色素原基質を与えて該着色反応生成物を検出化することを含むことを特徴とする、請求の範囲17に記載の方法。

21. (a) 試料を、標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的な少なくとも1個の1本鎖塩基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共に、該ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得る該哺乳類標的ポリヌクレオチドの突然変異又は非突然変異配列にハイブリッド形成をしてハイブリッドを形成するのに適した条件下でインキュベートし、

(b) 段階(a)で形成されたハイブリッドをミスマッチ-結合蛋白質と接触せしめ、

(c) 該ハイブリッドに結合したミスマッチ-結合蛋白質の結合を検

出する方法。

7. 放出された核酸につき、該変性の前に制限エンドヌクレアーゼ切断段階を行うことを特徴とする、請求の範囲6に記載の方法。

8. 該ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを段階(a)の該インキュベートの前に懸濁液上に固定することを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

9. 該懸濁液がニトロセルロース膜であることを特徴とする、請求の範囲8に記載の方法。

10. 該検出段階が検出可能な標識をされ、該ミスマッチ-結合蛋白質に結合することができる第1結合パートナーの添加を含むことを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

11. 該第1結合パートナーが該ミスマッチ-結合蛋白質に特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲10に記載の方法。

12. 該検出段階が、該ミスマッチ-結合蛋白質に結合でき、検出可能な標識をされていない第1結合パートナー、及び該第1結合パートナーに結合することができる第2結合パートナーの添加、及び該第2結合パートナーの存在の検出を含むことを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

13. 該第2結合パートナーが該第1結合パートナーに特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲12に記載の方法。

14. 該第2結合パートナーがMusL蛋白質又はその機能の誘導体であることを特徴とする、請求の範囲12に記載の方法。

15. 該第2結合パートナーがMusL及び検出可能な第2蛋白質あるいはペプチドの融合蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲14に

出する段階を含み、それによりミスマッチ-結合蛋白質の結合の検出が試料の哺乳類ポリヌクレオチドの配列中の突然変異の存在の指標となることを特徴とする、試料中の1本鎖標的哺乳類ポリヌクレオチドの非突然変異配列から突然変異を検出する方法。

22. その中に1個又はそれより多い容器を与えられるように適合せられ、

(a) 標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的な少なくとも1個の1本鎖塩基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを含む第1容器；

(b) ミスマッチ-結合蛋白質を含む第2容器；及び

(c) ミスマッチ-結合蛋白質の該ハイブリッドへの結合を検出することができる試薬又は試薬群を含む第3容器あるいは複数の容器を含む、試料中の標的ポリヌクレオチド配列の非突然変異配列から突然変異配列を検出するのに有用なキット。

23. 該ミスマッチ-結合蛋白質がMusS又はその機能の誘導体であることを特徴とする、請求の範囲22に記載のキット。

24. 該試薬又は試薬群がミスマッチ-結合蛋白質と結合することができる少なくとも1個の第1結合パートナーを含むことを特徴とする、請求の範囲22に記載のキット。

25. 該第1結合パートナーがミスマッチ-結合蛋白質に特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲24に記載のキット。

26. 該試薬又は試薬群が、該ミスマッチ-結合蛋白質に結合でき、検出可能な標識をされていない第1結合パートナー、及び該第1結合パートナーに結合できる第2結合パートナーを含むことを特徴とする、請求

の範囲19に記載のキット。

27. 該第2結合パートナーが該第1結合パートナーに特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲26に記載のキット。

28. 該第1結合パートナーがMut L蛋白質又はその機能的新導体であることを特徴とする、請求の範囲26に記載のキット。

29. 該第1結合パートナーがMut L及び検出可能な第2蛋白質又はペプチドの間の融合蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲28に記載のキット。

30. 該第2蛋白質がペーサー・ガラクトシダーゼであることを特徴とする、請求の範囲29に記載のキット。

31. 該第2結合パートナーがMut L蛋白質又は機能的新導体に結合できることを特徴とする、請求の範囲29に記載のキット。

32. 該ハイブリッド形成パートナーを固体担体上に固定することを特徴とする、請求の範囲22に記載のキット。

33. 該固体担体がニトロセルロース膜であることを特徴とする、請求の範囲31に記載のキット。

34. 該ミスマッチ結合蛋白質が酵素と融合した融合蛋白質であり、該酵素が該酵素のための色素原基質を含むことを特徴とする、請求の範囲19に記載のキット。

(Albarella *et al.*, 欧州特許第144914号明細書)、化学標識 (Sheldon *III et al.*, 米国特許第4,582,789号明細書; Albarella *et al.*, 米国特許第4,563,417号明細書)、修飾塩基 (Miyoshi *et al.*, 欧州特許第119448号明細書) などの多様な標識がこの目的で用いられてきた。

いくつかの核酸検出系が特定の突然変異の検出のために設計され、それはプローブと追加の結合パートナーの組み合わせを含み、後者はレポーターとして働く。Paeu *et al.*, 米国特許第4,556,643号明細書は、標的-特異的配列及び蛋白質-結合配列を有するポリヌクレオチドプローブを開示している。ほとんどの場合そのような蛋白質-結合配列は、標的-特異的セグメントに連結されたDNAの外側セグメント (extra segment) である。用いられる結合蛋白質は、蛋白質-酵素複合体などの蛋白質-マーカー複合体の一種であることができる (例7、行7-10)。開示されている結合蛋白質はDNA-修飾酵素、ポリメラーゼ、ラクトースリプレナー又は抗原性DNA配列である (例7、行10-29)。この参考文献に記載されているプローブの典型的例 (実施例1、例12及び13) は、cDNA分子 (標的DNA配列とハイブリッド形成できる) であり、それにT7プロモーター (蛋白質結合配列) が連結されている。このプローブのハイブリッド形成後にE. コリ (*E. coli*) RNAポリメラーゼが結合蛋白質として加えられ、T7プロモーターに結合する。結合したRNAポリメラーゼの存在は、ポリメラーゼに特異的なウサギ抗血清、及びその後パーオキシダーゼ-複合化ヒツジ抗ウサギ第2抗体、ならびにバ

背景の説明

試料中の特定の核酸分子の存在を検出できる検出法は、病気の予想及び診断、法医学、疫学及び公衆衛生において実質的に重要である。そのような検出法は例えば患者における突然変異遺伝子の存在の検出に用いることができ、患者が遺伝病に罹る可能性を決定することができる。細胞の発癌遺伝子における置換の突然変異がその発癌遺伝子を活性化し、その細胞を癌細胞に変換し得るという発見と共に、癌の早期発見又は癌に罹り易さの発見における突然変異の検出能力の重要性が増してきた

(Nishimura, S. *et al.*, *Biochem. J.* 243: 313-327 (1987); Bos, J. L., *Cancer Res.* 49: 4682-4689 (1989))。

核酸検出検定法は、核酸分子の多くの特性、例えばその寸法、配列、制限エンドヌクレアーゼにより消化される傾向などのいずれに基づくこともできる。そのような検定法の感度は、検出が報告されるか又は観察者に信号が送られる方法を定めることにより向上させることができる。従って例えば検出可能な標識をした試薬を用いることにより検定感度を向上させることができる。酵素標識 (Kourilsky *et al.*, 米国特許第4,581,339号明細書)、放射性同位体標識 (Falkow *et al.*, 米国特許第4,358,535号明細書; Berninger, 米国特許第4,446,236号明細書)、蛍光標識

ーオキシダーゼ-抗パーオキシダーゼ検出系により検出される。

Mundy, 米国特許第4,656,127号明細書は、特定のヌクレオチド塩基の突然変異を検出する方法を開示しており、それは問題の領域の配列がわかっていることが必要であり (例1、行52-43)、突然変異が制限部位になくても良いという利点を有する。突然変異の部位から1方向に延びる核酸鎖の一部に相補的な直鎖状プローブが開示されている。ハイブリッド形成後に、特定の塩基配列が存在するか不在かに依存してプローブの末端に結合するヌクレオチド誘導体が入えられる。1本鎖部分は消化される。その後プローブの存在又は不在が検出される (例2、行3-22)。参考文献ではヌクレオチド誘導体としてデオキシヌクレオチドが考えられており (例4、行46-51)、それは検出可能な標識をすることにより検出される。

Kato *et al.*, 欧州特許公開第407,789号明細書は、標識プローブを用いたハイブリッド形成に基づく核酸の検出法を開示している。非放射性標識の中に、ビオチン-アビシン系を用いた酵素及び蛍光が挙げられている (頁2、行36-39)。標識の例はビオチン-標識dUTPであり、合成によりプローブ中に挿入される。

核酸ハイブリッドにおけるミスマッチ塩基対の検出のために設計された多くの方法が当該技術分野において既知である。初期の方法はミスマッチの酵素切断に基づいていた (Cibbe, R. *et al.*, *Sci. ence* 236: 303-305 (1987))。これらの方法はミスマッチDNAハイブリッドを酵素により切断する段階を含む。これらの方法の欠点の1つは、すべてのミスマッチを確実に検出しないことである。最近記載されたミスマッチDNAの切断のための化学的方法

(Cotton, R. G. et al., Proc. Natl. Sci. USA 85: 4397-4401 (1988); Cotton, R. G., Nuc. Acids Res. 17: 4223-4233 (1989)) は多くの試薬、特に四酸化オスミウム及びヒドロキシルアミンを用いたDNA-DNAヘテロ2本鎖におけるミスマッチ部位の化学的切断に基づく。この方法の場合、DNAプローブは問題のDNAの制限酵素切断により調製される。問題の配列を含むプラスミドDNAを制限酵素で切断し、 ^{32}P を用いた末端一本鎖又は内部標識にハイブリッド形成させる。ヒドロキシルアミンはミスマッチしたシトシンを化学的に修飾し、四酸化オスミウムはミスマッチしたチミンを修飾する。その後ピペリジンを用いて修飾部位でDNAを切断し、続いてポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)及びオートラジオグラフィを行い、切断生成物を同定する。この方法は、ミスマッチに隣接する正常の塩基対での切断も生ずるので、すべての可能な1個のミスマッチ塩基対を検出するという利点を有すると言われている。

Caskey及び共同研究者等は突然変異の位置決定の方法を開示しており、それはミスマッチ切断反応のための鈍型としてPCR増幅cDNAを用いる。この方法はオルニチントランスカルボミラーゼ(OTCase)欠乏症患者の研究で突然変異のマッピングに適用された。

Kung et al., 米国特許第4, 963, 658号明細書は、高親和性ssDNA-結合蛋白質、例えばトポソメラーゼ又はそれ自身が標識に結合できるDNA電圧し蛋白質(第2、行44-47)、例えば β -D-ガラクトシダーゼ(第7、行1)との結合による、1本鎖

単DNAに同一の処理が行われるように内部制御することができる。最後に方法は、例えば膜フィルター上の着色「プラス」又は「マイナス」の印などの、簡単に解釈の容易な結果を与えるように設計することができる。

本発明は2つの重要要素に基づいている。第1は誤対合又は非対合塩基を含む核酸ヘテロ2本鎖に結合する蛋白質の存在である。そのようなミスマッチ-結合蛋白質の周知の例はバクテリア蛋白質、例えばDNA修復において機能するE. ColiのMut S蛋白質である。第2の要素は特定の遺伝子及びその突然変異対立遺伝子の単離及び配列決定が比較的容易であることである。

かくして本発明は、試料中の1本鎖ポリヌクレオチド(又は鎖的ポリヌクレオチド)の配列中に突然変異が存在するかどうかを決定する方法を目的とする。すなわちそれは突然変異鎖的ポリヌクレオチドの検出、あるいはポリヌクレオチド(DNA又はRNA)中に突然変異が存在(又は不在)するかどうかの決定の方法である。

方法において、突然変異鎖的ポリヌクレオチドに関して分析される試料は、非突然変異鎖的ポリヌクレオチドの配列と相補的な少なくとも1個の1本鎖塩基配列である1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共にインキュベートされる。ハイブリッド形成パートナー及び、突然変異鎖的ポリヌクレオチドに関して評価されるポリヌクレオチド(例えばDNA又はRNA試料)は、ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得るいずれの突然変異又は非突然変異鎖的ポリヌクレオチドともハイブリッド形成するために適した条件下でインキュベートされる。相補的配列がハイブリッド形成すると、ハイブリッド形成パート

DNA(ssDNA)の検出につき開示している。

現在利用される検定法の用途及び適用性を増す望みは多くの場合、感度ならびに信頼性及び経費により失敗してきた。従ってより感度が高く、簡単に、比較的安価な、DNAにおける改変の検出のための検定法の開発が非常に望まれている。

発明の要旨

本発明は配列中に1塩基の変化のような小さい変化を含む核酸配列の突然変異を検出する方法に関する。試料中に鎖的ポリヌクレオチドが存在する程度も決定することができる。本方法はE. Coli及びサルモネラ(Salmonella)のMut S蛋白質を例とするミスマッチ-結合蛋白質の利用に基づいている。本明細書で用いられる鎖的ポリヌクレオチドという用語は検出されるべき核酸配列である。突然変異を含む鎖的ポリヌクレオチド配列(非改変形)は、非突然変異鎖的ポリヌクレオチド又は非突然変異鎖的配列と置かれる。突然変異又は改変を含む鎖的ポリヌクレオチド配列は、突然変異鎖的ポリヌクレオチドと置かれる。本方法は、例えば突然変異発症遺伝子の存在を検出することにより、多様な重要疾患状態又は罹り易さを診断するのに有用である。方法はPCRに基づく方法の効率に関する利点を共有するが、実施することがもっと簡単に安価である。発明者等は本発明の方法を行うためのキットの開発も行った。

分析するDNAは血液細胞、精子又は生物、好ましくはヒトの組織から得たDNAなどのいずれの種類のであってもよい。本発明の方法はPCRで用いられるような精巧な、又は高価な装置を必要とせず、洗練された訓練なしで技術者が行うことができる。方法は、試験試料及び標

的ポリヌクレオチドのハイブリッドが形成される。形成されたハイブリッドを、ミスマッチ-結合蛋白質が突然変異鎖的ポリヌクレオチドに結合するのに適した条件下で、ミスマッチ-結合蛋白質と合わせる、又は接触させる。これによりミスマッチ-結合蛋白質が、鎖的ポリヌクレオチドが突然変異鎖的ポリヌクレオチドであるハイブリッドに結合することになる。ハイブリッドに結合したミスマッチ-結合蛋白質の存在の検出は、試料中のポリヌクレオチドの配列中に突然変異が存在することを示す(すなわち突然変異鎖的ポリヌクレオチドの存在を示す)。

上記において、ハイブリッド形成パートナーはDNA、例えばcDNA又は合成オリゴヌクレオチドであることが好ましい。鎖的ポリヌクレオチドはDNA又はRNAであることができる。好ましいRNAはmRNAである。

上記の方法で、好ましいミスマッチ-結合蛋白質はMut S蛋白質あるいはその機能的同義体である。

方法のステップ1において試料は、存在するいずれの塩基も放出し、変性する(1本鎖とする)のに十分な状態に合わせた生物学的液体である。場合により放出された核酸につき、変性の前に制限エンドヌクレアーゼ切断の段階を行う。

ある態様の場合、ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを固体固相上に固定し、得られた固体固相-結合ハイブリッド形成パートナーを突然変異鎖的ポリヌクレオチドの存在に関して評価されるべきポリヌクレオチドの試料と共にインキュベートする。好ましい固体固相はニトロセルロース膜である。

検出段階は、ミスマッチ-結合蛋白質と結合する検出可能な標識をし

た第1結合パートナーを加えることを含むのが好ましい。第1結合パートナーは例えばミスマッチー結合蛋白質に特異的な抗体、又は検出される着色反応生成物の形成を触媒する酵素であることができる。

他の態様の場合、検出段階はミスマッチー結合蛋白質と結合し、検出可能な標識をされていない第1結合パートナー、及び第1結合パートナーと結合する第2結合パートナーを加え、第2結合パートナーの存在を検出することを含む。第2結合パートナーはそれ自身検出可能な標識をされていることができ、又は第2結合パートナーに結合する検出可能な標識をされた第3結合パートナーを用いることもできる。好ましい第2結合パートナーは第1結合パートナーに関する抗体である。他の態様の場合、第2結合パートナーはMu11蛋白質又はその機能的特異体、好ましくはMu11と検出可能な第2蛋白質又はペプチドの間の融合蛋白質である。融合蛋白質における好ましい第2蛋白質はペクターガラクトシダーゼである。

他の態様の場合、ミスマッチー結合蛋白質は融合蛋白質の1成分であり、その第2成分は直接（すなわちそれ自身が検出可能）又は間接的に（すなわち検出可能な試薬を用いて）検出することができる第2蛋白質又はペプチドである。この態様の場合、検出段階は融合蛋白質中に存在する第2蛋白質又はペプチドと結合する、検出可能な標識をした結合パートナーを加えることを含むのが好ましい。第2蛋白質は色素原酵素基質からの着色反応生成物の形成を触媒することができる酵素であることができる。検出段階は、色素原基質を与えて着色反応生成物を視覚化することを含む。好ましい第2蛋白質はペクターガラクトシダーゼである。

本発明はさらに、試料中の1本鎖鎖的哺乳類ポリヌクレオチドの非突

然変異配列から突然変異配列を検出（区別）する方法を目的とする。この方法では既知の方法を用いて哺乳類ポリヌクレオチドの試料（DNA又はRNA）を得る。例えばDNA又はRNAを細胞から得、それを処理して1本鎖とし、非突然変異鎖的哺乳類ポリヌクレオチドの配列と相補的である少なくとも1つの1本鎖塩基配列である1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共にインキュベートすることができる。DNA又はRNA及びハイブリッド形成パートナーを、ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得るいずれの突然変異又は非突然変異鎖的ポリヌクレオチドともハイブリッド形成するために適した条件下でインキュベートする。相補的配列がハイブリッド形成すると、ハイブリッド形成パートナーと鎖的ポリヌクレオチドのハイブリッドが形成される。形成されたハイブリッドを、鎖的ポリヌクレオチドが突然変異鎖的ポリヌクレオチドであるハイブリッドとミスマッチー結合蛋白質が結合するのに適した条件下で、ミスマッチー結合蛋白質と合わせる、又は接触させる。ハイブリッドに結合したミスマッチー結合蛋白質の存在の検出は、試料の哺乳類ポリヌクレオチドの配列中に突然変異が存在することを示す（すなわち突然変異鎖的ポリヌクレオチドの存在を示す）。

本発明は試料中の突然変異鎖的ポリヌクレオチドの検出（非突然変異鎖的ポリヌクレオチド配列からの突然変異鎖的ポリヌクレオチドの区別）に有用なキットを含む。キットは以下を含む：

(a) 鎖的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的（すなわち非突然変異鎖的ポリヌクレオチドに相補的）な少なくとも1個の1本鎖塩基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを含む第1容器；

(b) ミスマッチー結合蛋白質を含む第2容器；及び

(c) ミスマッチー結合蛋白質のハイブリッドへの結合を検出することができる試薬又は試薬群を含む第3容器あるいは複数の容器。

上記のキットにおいて、ミスマッチー結合蛋白質はMu11S又はその機能的特異体である。試薬又は試薬群は、ミスマッチー結合蛋白質に結合することができる検出可能な標識をされた第1結合パートナーを少なくとも1個含むのが好ましい。好ましい第1結合パートナーはミスマッチー結合蛋白質に特異的な抗体である。

キットの別の態様の場合、試薬又は試薬群は検出可能な標識をされていない第1結合パートナーを含む、第1結合パートナーはミスマッチー結合蛋白質と結合することができる、抗体などの第2結合パートナーが第1結合パートナーに結合することができる。第2結合パートナーは検出可能な標識をされていることができる。第2結合パートナーが標識されておらず、第2結合パートナーに結合することができる、検出可能な標識をされた第3結合パートナーを含むキットも意図されている。

好ましいキットの態様の場合、第1結合パートナーはMu11蛋白質又はその機能的特異体、例えばMu11と検出できる第2蛋白質又はペプチド、好ましくはβ-ガラクトシダーゼの間の融合蛋白質である。第2結合パートナーはMu11蛋白質又はその融合パートナー蛋白質に結合することができる、例えばβ-ガラクトシダーゼに特異的な抗体である。

上記のキットにおいて、ハイブリッド形成パートナーは固体担体上に固定されているのが好ましい。好ましい固体担体はニトロセルロース膜である。

キットの他の態様において、ミスマッチー結合蛋白質は酵素と融合し

た融合蛋白質であり、試薬は酵素に関する色素原基質を含む。

図面の簡単な説明

図1はオリゴヌクレオチドの形態のハイブリッド形成パートナー又はcDNAハイブリッド形成パートナーの、試験又は“鎖的”DNAとのハイブリッド形成を示す略図である。図の下部はミスマッチ含有ハイブリッドの形状を示す。cDNAがゲノムDNAフラグメントとハイブリッド形成した場合、ゲノムDNAの非ハイブリッド形成部分（イントロン）は環状に突き出ることが示されている。

図2は本発明の突然変異検出検定の略図である。この特定の態様の場合、ミスマッチー結合蛋白質の存在は、ミスマッチー結合蛋白質に特異的な抗体である第1結合パートナーを用いて検出される。この抗体は検出可能な標識をされることができ、又は検出可能な標識をされた試薬により検出されることができ（右下）。代わりに検出段階は第2結合パートナー、この場合第1抗体に特異的な抗体（“抗-A b (Anti-A b)”）を用いて増幅することができる（左下）。

図3は実施例に記載されている特定の検定型式の略図であり、この場合正及び負の標準がニトロセルロースフィルター上に置かれており、ミスマッチが存在しない場合に目に見える“マイナス”の印が得られ、鎖的DNAが突然変異（ミスマッチ）を含む場合に目に見える“プラス”の印が得られる。

図4は溶液中でアニールされたヘテロ2本鎖におけるミスマッチ検出の結果を示す。

図5は固定オリゴヌクレオチドにアニールされたヘテロ2本鎖におけるミスマッチ検出の結果を示す。

図6は競争オリゴヌクレオチドの存在下でアニールされたヘテロ2本鎖におけるミスマッチ検出の結果を示す。

好ましい態様の説明

本発明者等は、1個の塩基の変化のような小さい改変でさえDNA配列中の改変を検出するための、広く適用でき、比較的簡単な新規方法を計画した。バクテリアDNAのミスマッチ修復機構は、塩基対のミスマッチを含む2本鎖DNAを認識してそれと結合する1個の蛋白質又は蛋白質の群を利用している(詳しくは、Radman, M. *et al.*, *Annu. Rev. Genet.* 20:523-538 (1986); Radman, M. *et al.*, *Sci. Amer.*, August 1988, pp. 40-46; Modrich, P., *J. Biol. Chem.* 264:6597-6600 (1988) を参照)。Mut S蛋白質はE. コリのミスマッチ修復系におけるそのような成分として同定された(Lahue, R. S. *et al.*, *Science* 245:160-164 (1989); Jiricny, J. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:7843-7853 (1988); Su, S. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263:6829-6835 (1988); Lahue, R. S. *et al.*, *Mutat. Res.* 198:37-43 (1988); Lahue, R. S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1482-1486 (1987); Dohet, C. *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 206:181-184 (1987); Jones, M. *et al.*, *Genetics* 115:605-610 (1987); Su, S. S. *et al.*, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 83:5057-5061 (1986); Dohet, C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:503-505 (1985); Choy, H. E. *et al.*, *Mutat. Res.* 142:93-97 (1985); Jones, M. *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 184:562-563 (1981))。サルモネラ チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) のMut S (Lu, A. L. *et al.*, *Genetics* 118:593-600 (1988); Haber, L. T. *et al.*, *J. Bacteriol.* 170:197-202 (1988); Pang, P. *et al.*, *J. Bacteriol.* 163:1007-1015 (1985)) 及びストレプトコッカス ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*) のhex A蛋白質 (Priebe, S. D. *et al.*, *J. Bacteriol.* 170:190-196 (1988); Haber *et al.*, 同上) を含む類似の蛋白質が他のバクテリア種で既知である。

精製Mut S蛋白質はミスマッチ塩基を含むDNAと結合するが、ミスマッチを含まないDNA、又は1本鎖DNAに結合しない。Mut S-DNA相互作用はDNAの分解又は改変を生じない。

本方法は、突然変異DNAの鎖と野生型DNAの“相補的”鎖がハイブリッド形成した場合に形成されるミスマッチDNAヘテロ2本鎖の検出に基づいている(図1を参照)。ミスマッチの存在は、最初にMut S蛋白質E. コリなどのミスマッチ-結合蛋白質をDNA 2本鎖と結合させることにより、特異性の高い方法で検出することができる。結合し

たミスマッチ-結合蛋白質の存在を、その後多くの方法のいずれか1つを用いて、例えばミスマッチ-結合蛋白質に特異的であり、検出可能な標識をした抗体、例えば抗-Mut S抗体を用いることにより検出する。この方法は、ミスマッチ塩基対にて、又はその近辺でDNAを破壊することができるミスマッチ切断ヌクレアーゼ酵素を用いる先行技術の方法と対照的に、そのまま保つ。この方法の概略に関して、図2を参照せよ。

本発明の方法により、試料中の特定の“標的”核酸分子又はポリヌクレオチドの存在を検出することができる。そのような試料は典型的に生物試料、例えば血液、精子、便、血清、尿、唾液、地盤など、ならびに非生物試料、例えば排水又は飲料水、牛乳あるいは他の食物、空気などである。

本発明の方法により検出される標的ポリヌクレオチド又は核酸分子はDNA又はRNAであることができるが、DNAが好ましい。ハイブリッド形成パートナーがcDNAの場合、標的核酸はDNA又はmRNAであることができ、mRNAがより高いコピー数で存在する。本明細書で用いられる“標的核酸”、“標的ポリヌクレオチド”又は“標的配列”という用語は、検出及び/又は定量されるべき問題の配列を含む核酸を言う。それは野生型配列を含むこともでき、その場合それは野生型又は非突然変異標的ポリヌクレオチドあるいは非突然変異標的配列と言われる。別の場合それは改変又は突然変異(野生型から突然変異した)を含むことができ、その場合それは突然変異標的ポリヌクレオチドと言われる。標的核酸における標的配列は、ポリヌクレオチド内に改変又は突然変異が存在してもプローブDNA(ハイブリッド形成パートナー)とハイブリッド形成するのに十分な長さでなくてはならない。標的配列は、

本方法により検出されるために30塩基より大きいことが好ましい。標的の1つの場合、ミスマッチ-結合蛋白質の結合及びそれに続く検出ができるために、標的配列に関する必要なミスマッチを含む配列を有する“ハイブリッド形成パートナー”ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの標識を可能にするために、標的ヌクレオチド配列が既知でなければならない。

他の態様の場合、cDNA分子がハイブリッド形成パートナーとして用いられる。この場合、標的ヌクレオチド配列をあらかじめ知る必要はない。ゲノムDNAフラグメントとcDNAがハイブリッド形成すると、cDNA中に与えられていないイントロンが不對ループを形成し(図1を参照)、これはミスマッチ-結合蛋白質に検出されないし、1個の塩基不対合又は1-4塩基対の付加又は欠失によって起こるミスマッチにミスマッチ-結合蛋白質が結合するのを妨げもしない。

本発明の方法は、多くのより最近考案された突然変異検出検定で共通に必要な、突然変異標的核酸分子の増幅を必要とせずにそのような分子(DNA又はRNA)を検出することができるという利点を有する。本発明は、1個又はそれより多い野生型標的ヌクレオチド配列に相補的な配列を有する、cDNA分子を含む1個又はそれより多いハイブリッド形成パートナーオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド分子の精製及び利用によりこの目標を達成する。ハイブリッド形成パートナーは標的核酸分子とハイブリッド形成ことができ、塩基対のミスマッチ又は不對塩基が起った場合、このミスマッチ又は不對塩基がミスマッチ-結合蛋白質により認識される。

好ましい態様の場合、ハイブリッド形成パートナーは1本鎖核酸分子

であり、1本鎖DNAが最も好ましい。

標的核酸分子は、例えば真核細胞、原核細胞、ウイルス、ウイロイドなどからのDNA又はRNAであることができる。標的核酸分子は哺乳類起源のものが好ましく、ヒト起源のものが最も好ましい。真髄は「標的」核酸分子のヌクレオチド配列又は配座に制限はない。

付加又は欠失の小さなフレームシフト突然変異も、ミスマッチ結合蛋白質が結合するような方法で野生型配列と対合する配列を生ずる。例えばE. コリMut Sに基づく修復系(Radman, M. et al., Annu. Rev. Genet. 20: 523-538 (1986))及びストレプトコックス ニューモニアエ HcXミスマッチ修復系の両方共、1個の塩基の付加又は欠失から生ずるミスマッチに作用することが知られている。2又は3個の塩基対、ならびに程度は少ないが4個の塩基対の付加又は欠失も修復されるが、5個の塩基対の付加又は欠失は修復されない。従って本発明の方法は1-4個の塩基対の小さな付加又は欠失突然変異の検出に有用である。

2本鎖(ds) DNA中の特定の1個の塩基の突然変異を検出する場合、2個の突然変異DNA鎖のそれぞれに1個の塩基を融いて相補的である2個の野生型ハイブリッド形成パートナー配列を用いるのが、1個のハイブリッド形成パートナーのみを用いた場合と比較して検定の感度が2倍に向上するので好ましい。しかし検定は十分感度が高く、感度が2分の1に低下(2個のハイブリッド形成パートナーを用いる場合に比較して)しても本方法の有用性は低下しないので、2個のDNA鎖の1個のみに相補的な1個のハイブリッド形成パートナー配列を用いることもできる。

Biol. 21: 101-141 (1978))により開示されている。別の場合RNAハイブリッド形成パートナーは、細胞の天然の産物として、例えばmRNA分子として単離することができる。RNA又はcDNAハイブリッド形成パートナーは組み替えDNA法によっても調製することができる。(例えばGreen et al., Cell 32: 681 (1983)を参照)。DNAハイブリッド形成パートナーは当該技術分野における熟練者に容易に明らかになる多様な供給源のいずれからも、例えば天然に存在するDNAの制限エンドヌクレアーゼ切断又は化学的切断により調製することができる。

E. コリMut Sが16塩基のヘテロ2本鎖に結合し(Jiricny et al., 同上)、フットプリント法でMut Sにより保護されるヘテロ2本鎖の大きさが8-12塩基程度の小ささである(Su, S-S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5057-5061 (1986))ことを考慮すると、本発明のハイブリッド形成パートナーの大きさの下限は約10ヌクレオチドである。合成経費を安く保ちながらハイブリッド形成の忠実度を増すために、より大きなハイブリッド形成パートナー、好ましくは約20-約100ヌクレオチドが好ましい。オリゴヌクレオチド合成の経費を考慮し、より好ましいオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーは約20-約40ヌクレオチドを有する。本明細書に記載する組み替え法を製造に用いることができるので、ハイブリッド形成パートナーの大きさに上限はない。従って別の態様の場合、cDNA分子そのまがハイブリッド形成パートナーである。

本発明の方法で用いるために、ハイブリッド形成パートナー配列は固

例えばMut Sなどのミスマッチ結合蛋白質はすべての可能なミスマッチに等しい効率で結合しないので(Dohet, C. et al., 1985, 同上; Jones, M. et al., 1987, 同上)、ある種の標的配列の場合は問題の領域における両鎖に相補的なハイブリッド形成パートナーを調製し、与えられたdsDNA野生型配列から2個の可能なミスマッチの両方を形成して2個の突然変異の少なくとも1個を検出することが必要である。

ハイブリッド形成パートナーは、1個より多い塩基対がミスマッチしているより大きな標的配列に相補的な1個の連続したポリヌクレオチドセグメントであることができる。別の場合、標的DNAの1個のフラグメント上で約30塩基か又はそれ以上隔てられた2個の突然変異を、それぞれが1個の標的フラグメント上の別々の配列とハイブリッド形成する2個か又はそれ以上の個別のハイブリッド形成パートナーを用いて検出することができる。

態様の1つにおいて、標的配列に相補的なハイブリッド形成パートナーの領域は、ハイブリッド形成可能部分がその中でミスマッチ結合蛋白質がミスマッチを認識して結合する少なくとも約30ヌクレオチドの安定なヘテロ2本鎖を形成するならば、3'又は5'末端にて非ハイブリッド形成配列によりフランキングされていることができる。

RNA又はDNAハイブリッド形成パートナーは多様な周知の方法で調製することができる。従来の方法を用いた化学的オリゴヌクレオチド合成によりオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを調製するのが最も好ましい。オリゴヌクレオチドの合成法は、例えばWu, R., et al., Prog. Nucl. Acid. Res. Moiec.

定可能な形態であるか、より好ましくは固相担体又はキャリアー上に固定されている(図3を参照)。ハイブリッド形成パートナーの固定可能な形態は、一般にハイブリッド形成反応の後に簡単に固定することができる形態である。最後にハイブリッド形成パートナーが固定される方法は本発明に重要ではなく、ハイブリッド形成パートナーと標的核酸配列の間で形成されたハイブリッドがハイブリッド形成パートナーの性質により固定されれば、利用できるいずれの方法を取ることもできる。

固定された形態でハイブリッド形成反応に導入される場合、ハイブリッド形成パートナーは、ハイブリッド形成パートナー及びそれと結合する反応混合物のいずれの成分も、後で残りの混合物から単離又は分離することができるようにいずれの適した形態であることもできる。分離は遠心、濾過、クロマトグラフィー、デカンテーションなどにより行うことができる。

当該技術分野における通常の熟練者は、本発明に従って有用な固定ハイブリッド形成パートナーの多様な組成及び形状が分かるであろう。例えばハイブリッド形成パートナーは凝集又は他の場合沈殿させる、不溶性材料、ポリマー又は担体に結合する、あるいはアグロース又はポリアクリルアミドなどのゲル中に閉じ込めることができる。(Meth. Enzymol., 128: 635 (1968); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67: 807 (1970))。最も好ましいのは、ハイブリッド形成パートナーが共有結合又は非共有結合により結合又は固定された固相担体である。適度に安定で強い結合を有する方法を用いた吸着による非共有結合が好ましい。これは又、ハイブリッド形成パートナーへのアミノ修飾基を用いても行うことができ、アミノ基

鎖を用いてハイブリッド形成パートナーを固体担体（例えば膜又はフィルター）に“ひっかける（hook）”又は結合する。所望のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを選ばれた固体担体に結合する方法は当該技術分野における通常の熟練者に周知である。

“固相担体”はオリゴ又はポリヌクレオチドを結合することができるいずれの担体も意味する。周知の担体又はキャリアーには天然又は合成セルロース、例えばニトロセルロース、ポリステレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド及びアガロースが含まれる。実際に担体材料は、固定されたハイブリッド形成パートナーが限定的核酸分子とハイブリッド形成することができ、ミスマッチ結合蛋白質がその後ハイブリッド形成パートナー—極的ポリヌクレオチドハイブリッドに結合することができれば、いずれの可能な構造的形状であることもできる。かくして担体形状は微粒子、ビーズ、多孔質及び不透過性ストリップ及び膜、試験管及びマイクロタイクプレートなどの反応容器の内表面などを含むことができる。好ましい担体にはニトロセルロース膜又はストリップが含まれる。当該技術分野における熟練者はオリゴ又はポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを結合するための多くの他の適した担体を知っているか、又は日常の実験によりそれを知ることができるであろう。

ニトロセルロース膜上にハイブリッド形成パートナーを吸着する好ましい方法は、ハイブリッド形成パートナーの溶液にロー化ナトリウムを飽和させ、アリコート膜上にスポット又は経過することを含む（Bresser *et al.*, *DNA* 2:243 (1983)）。別の場合ハイブリッド形成パートナーをグリオキサル（1M以下）で処理し、

その後膜上に吸着させることができる。真空下の80℃付近にて約2—3時間ベーキングすることによりハイブリッド形成パートナーを固定することができる（Thomas, P. S., *Math. Enzymol.* 100:255）。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーの共有結合固定も行うことができる。共有結合固定で有用な多数の担体材料及びカップリング法が知られている。例にはカーボジミド又はカルボニルジミドゾールにより活性化されたリン酸基を介したホスホセルロースへのカップリング（Bautz, E. K. F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:400-408 (1963); Shih, T. Y. *et al.*, *Biochemistry* 113:3411-3418 (1974)）、又はm-ジアゾベンゾイルオキシメチルセルロース上のジアゾ基のハイブリッド形成パートナーのG及びT残基との反応（Noyes, B. E. *et al.*, *Cell* 5:301-310 (1976); Reiser, J. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 85:1104-1112 (1978)）が含まれる。多糖担体は、水性カーボジミド活性化によりオリゴヌクレオチドの末端リン酸基と担体のヒドロキシル部分の間で形成されるホスホジエステル結合を介して（Richwood, D., *Biochim. Biophys. Acta* 269:47-50 (1972)）、又はオリゴヌクレオチド上の求核部位とシアノゲンブロミド—活性化担体のカップリングにより（Arndt-Jovin, D. J. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 54:411-418 (1975)）カップリングすることができる。さらにハイブリッ

ド形成パートナーの3' ヒドロキシ末端を過ヨウ素酸で酸化し、アミン又はヒドラジド基を有する担体とのシッフ塩基形成によりカップリングすることができる（Gillham, P. T., *Method. Enzymol.* 21:191-197 (1971); Hansake, H. D., *et al.*, *Method. Enzymol.* 59:172-181 (1979)）。求核部位を有する担体はシアマル酸塩化合物と反応させ、その後ポリヌクレオチドと反応させることができる（Hungler, H. D. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 653:344-349 (1981)）。

一般に、限定的配列に相補的な配列を試料核酸にハイブリッド形成するために利用できれば、いずれの方法もハイブリッド形成パートナーの固定に用いることができる。特定の方法及び材料は本発明に重要ではない。

直接固定ハイブリッド形成パートナーを用いる代わりに固定可能形態を用いることができ、適度論がより適い溶液中でハイブリッド形成段階を行うことができる。そのような態様の場合典型的に、固定形態の反応パートナーに露出すると反応パートナーと安定な共有結合又は非共有結合を形成して固定形態となることのできる反応性部位を含むハイブリッド形成パートナーが用いられる。ハイブリッド形成パートナー中のそのような反応性部位は、固定反応パートナーとして働くアビジン又は抗体などの結合物質と特異的共有結合が可能なビオチン又はハプテン部分などの結合部位である。

基本的にいずれの物質の対も安定な結合、すなわちその後の後定段階、主に分離及び後出段階の間、実質的にそのまま残る結合又はカップリングを形成する相互作用のための適した親和性を示す反応性部位/反応

性パートナー対を含むことができる。ハイブリッド形成パートナー上の反応性部位は“結合部位”と呼ばれ、反応パートナーはそれが共有又は非共有結合を形成する“結合物質”と呼ばれる。

態様の1つにおいて、結合部位はハイブリッド形成パートナーの非ハイブリッド形成部分に存在し、ハイブリッド形成パートナーの化学的修飾の結果であることが好ましい。ヌクレオチド配列内に存在する結合部位の例は、プロモーター蛋白質により結合することができるプロモーター配列、リプレッサー蛋白質により結合することができるオペレーター配列、又は特異的抗体により結合することができる修飾ヌクレオチド、例えば5-プロモデオキシウリジン又は5-ヨードデオキシウリジン（米国特許出願第2,125,964号明細書）、チミグリコール（Rajagopalan *et al.*, *Radiat. Res.* 97:499-510 (1984); Hubbard, K. *et al.*, *Radiat. Res.* 118:257-268 (1989)）である。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーの化学的修飾により導入される結合部位は特に有用であり、通常特異的結合対の1つのメンバーをハイブリッド形成パートナーに結合させることを含む。その中から選ばれべき有用な結合対にはビオチン/アビジン（即ちアビジン及びビオトレブタビジンを含む）、ハプテン（又は抗原）/抗体、酸水化物/レクテン、酵素/阻害剤などが含まれる。結合対が蛋白質メンバー及び非蛋白質メンバーを含む場合、蛋白質メンバーはハイブリッド形成の適性条件下で不安定なので非蛋白質メンバーをハイブリッド形成パートナーに結合するのが通常好ましい。好ましい系は、ハイブリッド形成パートナーをビオチン又はハプテンに結合し、それぞれ固定アビジン又は

抗-ハプテン抗体試薬を用いることを含む。

固定可能な形でハイブリッド形成パートナーがハイブリッド形成反応に導入される場合、それに続く形成された2本鎖の固定及びミスマッチ-結合蛋白質ならびに検出のための試薬の添加の段階は、いずれの所望の順序で行うこともできる。固定及びミスマッチ-結合蛋白質ならびに他の試薬の添加は、必要な試薬及び材料の同時の添加、あるいは洗浄又は分離段階の介在する、又は介在しないいずれかの順序の順次添加により行うことができる。順次添加に従う場合もちろん、形成されたハイブリッドを過飽和し、ミスマッチ-結合蛋白質及び検出試薬との相互作用を阻害しないように、加えられる試薬の濃度を考慮する。

好ましいミスマッチ-結合蛋白質は、1本鎖ポリヌクレオチド又は完全に対合しているハイブリッドを有意に誘離し、ハイブリッド形成パートナーと相補的な鎖的試料試薬の間で形成されたDNA-DNA (又はDNA-RNAあるいはRNA-RNA) 塩基対ミスマッチハイブリッドと結合する能力を有することを特徴とする。好ましい態様の場合、E. コリからの本来のMut S蛋白質そのまゝを用いる。しかし本明細書で用いられる“ミスマッチ-結合蛋白質”という用語は、本来の蛋白質そのまゝの機能的誘導体も含むものとする。“機能的誘導体”は、本発明に従い、ミスマッチ核酸ヘテロ2本鎖に結合する能力を保持している蛋白質の“フラグメント”、“変異体”、“類似体”又は“化学的誘導体”を意味する。

ミスマッチ-結合蛋白質の“フラグメント”は、分子のサブセット、すなわちより短いペプチドを言う。蛋白質の“変異体”は蛋白質全体又はそのDNA-ハイブリッド-結合フラグメントに實質的に類似する分子

を言う。ミスマッチ-結合蛋白質、例えばMut Sの変異体は、当該技術分野において周知の組み替えDNA法により調製することができる。

Mut Sの好ましい機能的誘導体は、E. コリMut Sの他のバクテリア種における同族体、例えばサルモネラ チフィリウムのMut S蛋白質 (Lu, A. L. *et al.*, 同上; Habet L. T. *et al.*, 同上; Pang, P. P. *et al.*, 同上) 又はストレプトコッカス ニューモニアエのHex A蛋白質 (Priebe S. D. *et al.*, 同上; Haber *et al.*, 同上) である。さらにMut S又はHex Aの可能な真核同族体、例えばヒト、マウス又はハムスターDNAにおいて同定された相配列によりコードされるものも用いることができる (Shimada, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 20171 (1989); Linton, J. *et al.*, *Molec. Cell. Biol.* 7: 3058-3072 (1989); Full, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 10057 (1989))。

ミスマッチ-結合蛋白質の“化学的誘導体”には、融合蛋白質の場合のような追加された配列のアミノ酸を含む、通常は蛋白質の一部でない付加された化学的部分が含まれる。ペプチドの共有結合による修飾は本発明の範囲内に含まれる。そのような修飾は、蛋白質の鎖的とされたアミノ酸残基を、選ばれた側鎖又は末端残基と反応することができる有機誘導剤と反応させることにより分子中に導入することができる。そのような誘導の例はハプテン-修飾であり、その場合トリニトロフェニルなどのハプテン基が蛋白質と共役し、検出可能な標識をした検出目的の結合パートナーの標的として働く。別の場合蛋白質をビオチン基の共役

により修飾することができ、検出可能な標識をしたアビジン又はストレプトアビジンを検出目的の結合パートナーとして用いることができる。

ミスマッチ-結合蛋白質の好ましい化学的誘導体は、ミスマッチ-結合蛋白質と他の蛋白質 (“融合蛋白質パートナー”) の間の融合蛋白質であり、その場合他の蛋白質が機能的又は機能的特徴を与えて融合蛋白質を検出に有用なものとする。例えば融合蛋白質パートナーは、検出目的で抗体が結合することができる抗原性部位に寄与することができる。ミスマッチ-結合蛋白質又は機能的誘導体及び酵素の間の融合蛋白質は、例えば当該技術分野において周知の通り融合蛋白質の酵素部分が色素原基質からの着色反応生成物の形成を触媒する能力があるために、検出のためのより直接的な手段を与える。

好ましい融合蛋白質は、Mut S又は機能的誘導体と酵素β-ガラクトシダーゼの間の融合蛋白質である。この態様の場合、固体担体へのβ結合の存在をこの酵素の色素原基質を用いて検出することができる。そのような基質の例はNABG (ナフトール AS-B1-β-d-ガラクトピラノシド) である。

ミスマッチ-結合蛋白質の融合蛋白質誘導体は、当該技術分野において周知の方法を用いて調製することができる (例えばSambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照)。

本発明の方法に有用な蛋白質の選択は、当該技術分野における通常の熟練者が従来の方法を用いて行うことができる。従って例えば本発明に

において有用なミスマッチ-結合蛋白質の存在に関して供給源を評価する場合、Jiricny *et al.*, (その参考文献の記載事項は引用することにより全体が本明細書の内容となる) により記載されているようなミスマッチ-結合検定を行うことができる。フィルター結合検定 (filter binding assay) を用いるのが好ましい。オリゴヌクレオチドヘテロ2本鎖の調製のために、好ましくは16塩基のオリゴヌクレオチドをキナーゼ反応を用いて³²Pで、及びT4-ポリヌクレオチドキナーゼなどのキナーゼを用いてガンマー-³²P-ATPで標識する。その後5' -末端オリゴヌクレオチド (これは-20°Cで保存できる) を、1個の塩基対ミスマッチを有する相補的オリゴヌクレオチドと標準的条件下でアニーリングする。アニーリングされた16塩基対ヘテロ2本鎖を過剰の試薬するべき蛋白質と混合し、水上に30分間保つ。その後混合物を検定緩衝液中で予備固定させたニトロセルロースフィルターに適用する。種やかに数秒間吸引し、フィルターを氷-冷検定緩衝液で強力に洗浄する。その後フィルターを空気乾燥し、シンチレーション液に懸濁し、カウントする。フィルターに付着した蛋白質のために、フィルター上のカウントはすべて推定ミスマッチ-結合蛋白質の結合に帰することができる。そのような蛋白質がない場合、標識されたオリゴヌクレオチドヘテロ2本鎖はフィルターを通過する。従ってそのような簡単な検定を用いることにより、本発明の方法で有用なミスマッチ-結合蛋白質を容易に検出し、選択することができる。

当該技術分野において既知の通り、種々のハイブリッド形成条件を本発明の方法で用いることができる。典型的にハイブリッド形成はわずかな高温、例えば約35°C-75°C、通常約65°Cにて、約6-8のpH

で過したイオン強度（例えば2X SSC、ここで1X SSC=0.15Mの塩化ナトリウム及び0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH 7.0）の緩衝液、ウシ血清アルブミンなどの蛋白質、Ficoll（Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ）により販売されているスクロース及びエビクロロヒドリンのコポリマーを限定する腐蝕）ポリビニルピロリドン、及びコウシ酸又はサケ精子からなどの酸性異種DNAを含む溶液中で行われる。ハイブリッド形成が起こるために必要な試料及びハイブリッド形成パートナー間の相補性の程度は、条件の複雑性に依存する。ハイブリッド形成の程度及び特異性は、以下の主条件により影響される。

1. 核酸試料の純度。

2. G-C塩基対の含有率：G-C塩基対はA-T又はA-U塩基対より高い熱安定性を示す。従ってG-C含有率の高いハイブリッドは高温で安定である。

3. 相同塩基配列の長さ：例えば6塩基より短いなどの短い塩基配列は多くの複製において繰り返し可能性が高い。そのような短い配列を含むハイブリッド形成においては特異性が低い、又は得られない。本発明のハイブリッド形成パートナー配列は、オリゴヌクレオチドの場合少なくとも約30塩基で最高約100塩基、cDNA分子の場合それより多く含まれることが好ましい。

4. イオン強度：再アニーリングの速度は、インキュベーション溶液のイオン強度の増加と共に増す。ハイブリッドの熱安定性も向上する。

5. インキュベーション温度：最適再アニーリングは、与えられた2本鎖の融点（T_m）より低い約25-30℃の温度で起こる。最適より

かなり低い温度でインキュベートすると、相補性の低い塩基配列をハイブリッドさせる。

6. 核酸濃度及びインキュベーション時間：通常反応をハイブリッド形成に駆動するために、ハイブリッド可能試料核酸又はハイブリッド形成パートナー核酸の1つが過剰に、通常100-1000倍過剰かそれ以上で存在する。

7. 変性試薬：ホルムアミド及び尿素などの水素結合切断試薬の存在は、ハイブリッド形成の複雑度を増す。

8. インキュベーション時間：インキュベーション時間が長い程ハイブリッド形成はより完全になる。

9. 体積排除試薬(volume exclusion agent)：デキストラン及びデキストランサルフェートを例とするこれらの試薬が存在すると、ハイブリッド形成成分の有効濃度が向上し、それにより得られるハイブリッド形成の速度が増すとと思われる。

通常、ハイブリッド形成の場合に置かれる温度条件は、形成されたハイブリッドへのミスマッチ-結合蛋白質の結合、又はミスマッチ-結合蛋白質への抗体又は他の結合パートナーの結合に適合しない。従ってミスマッチ-結合蛋白質及び結合パートナー試薬の結合段階及び標識検出段階は、ハイブリッド形成段階の完了後に行う。通常反応混合物を約3℃-約40℃の範囲の温度とし、その後ミスマッチ-結合蛋白質及び追加の試薬の結合ならびに検出段階を行う。

RNAハイブリッド形成パートナーを用いた特定の検定の場合、RNAがホスホジエステル結合のアルカリ加水分解により、又はリボヌクレアーゼ(Rnases)の存在により部分的に分解されることが予想さ

れる。前者の場合、ハイブリッド形成パートナーを約10より高いpHに暴露するのを避けることにより加水分解を抑制することができる。Rnasesは、ドデシル硫酸ナトリウム、アウリントリカルボン酸、リボヌクレオチドパナシル糖体、ヘパリンジェチルピロカーボネート及び哺乳類供給源から単離された蛋白質性Rnase阻害剤などの物質の存在により有効に阻害することができる。

ハイブリッド形成パートナー-標的オリゴヌクレオチド(DNA-DNA、DNA-RNA又はRNA-RNA)ハイブリッドに結合したミスマッチ-結合蛋白質は、直接又は間接に検出することができる(図2を参照)。直接検出は、ミスマッチ-結合蛋白質を検出可能な標識、例えば放射性標識、蛍光標識、免疫酵素などで標識することを意味し、それは下記にさらに詳細に記載する。別の場合、上記の通り組み替えDNA法により、ミスマッチ-結合蛋白質を検出の容易な融合パートナーとの融合蛋白質として生産することができる。融合蛋白質ならびに検出可能な標識をされた、又は共役したミスマッチ-結合蛋白質が本来の、改変されていないミスマッチ-結合蛋白質の反応性及び結合特異性を保持していることが重要である。この反応性及び特異性は、当該技術分野における通常の熟練者が、日常的試験、例えば本明細書に記載の検定により確かめることができる。

間接的検出は、ミスマッチ-結合蛋白質又はミスマッチ-結合蛋白質に共役した反応性部分、あるいはミスマッチ-結合蛋白質の融合蛋白質パートナーに特異的な結合パートナーを用いる方法を意味する。ミスマッチ-結合蛋白質がMu1Sの場合、好ましい結合パートナーは抗-Mu1S抗体(又はその抗原-結合フラグメント)である。

本発明の方法で有用な抗体試薬のいずれも抗体全体、抗体フラグメント、多機能抗体凝集体(polyfunctional antibody aggregates)、あるいは一般に抗体からの1個又はそれ以上の特異的な結合部位を含む物質を含むことができる。抗体は免疫グロブリンイソ型、例えばIgG、IgMなどのいずれかであることができる。そのような抗体の抗原-結合フラグメントのいずれか、例えばFab'又はF(ab')₂フラグメントを用いることもできる。さらに免疫グロブリン又はそのフラグメントの凝集物、ポリマー、誘導体及び共役体の場合により用いることができる。

抗体試薬のための免疫グロブリン供給源は、従来のポリクローナル抗血清の調製、又はモノクローナルあるいはキメラ抗体の調製などのいずれの方法によっても得ることができる。抗血清は、マウス、ウサギ、モルモット又はヒツジなどの動物をMu1S蛋白質などの適した免疫原で免疫化することを含む十分に確立された方法により得ることができる。

別の場合結合パートナーは、ミスマッチ-結合蛋白質と融合した融合蛋白質パートナー、例えばβ-ガラクトシダーゼに特異的な抗体であることができる。さらにミスマッチ-結合蛋白質分子に共役したハプテン基に特異的な抗体を用いることができる。他の結合パートナーは、ミスマッチ-結合蛋白質がビオチンの付加により修飾された場合のアビジン又はstreptavidinであることができる。さらに別の態様の場合、結合パートナーは免疫グロブリン分子に結合する性質を有する非免疫グロブリン蛋白質、例えば当該技術分野において周知のスタフィロコッカスのプロテインA又はstreptococcusのプロテインGであることができる。結合パートナーはそれ自身が検出可能な標識をされているか、又

は検出可能な標識をされた第2結合パートナー、例えば第1抗体に特異的な第2抗体により間接的に検出することもできる。かくしてウサギ-抗-ミスマッチ-結合蛋白質抗体が第1結合パートナーとして作用する場合、標識されたヒツジ-抗-ウサギ免疫グロブリン抗体は第2結合パートナーである。他の態様の場合、ミスマッチ-結合蛋白質の融合蛋白質パートナーの存在により生成される信号を、その融合蛋白質に特異的に検出可能な標識をされた抗体（例えば抗- β -ガラクトシダーゼ抗体）を用いた反応により増幅する。当該技術分野における通常の熟練者は、不必要な実験を行うことなく当該技術分野で周知の従来の方法を用い、そのような第1及び第2結合パートナー系として可能な多くを考察することができる。

さらに別の態様の場合、結合パートナーはE. コリ、S. チフィリウム又は他の供給源から得たMuL蛋白質 (Grilley, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **264**:1000-1004 (1989); Modrich, P., 1989, 同上; Lahue *et al.*, 1989, 同上) あるいはその機能性誘導体であることができる。好ましい機能性誘導体はMuLと検出の容易な第2結合パートナー蛋白質、例えば β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質である。分子量が90 kDaの精製MuL蛋白質はATPの存在下でMuL及び核酸ヘテロ2本鎖の複合体に選択的に結合することが知られている。MuLはミスマッチ-含有ヘテロ2本鎖又は遊離のMuLに直接は結合しない。MuL蛋白質はバクテリア中でクローニングされ、発現された (Pang *et al.*, 同上)。かくして本発明に従って用いる場合、好ましくは検出可能な標識をされた形態のMuL蛋白質又は

機能性誘導体はATPの存在下で突然変異検出検定に加えられる。その後結合MuLを検出する。別の場合、上記の通り非標識MuLを第1結合パートナーとして用い、その後MuLに結合する標識第2結合パートナーを用いるか、あるいは非標識第2結合パートナーを用いてから検出可能な標識をした第3結合パートナーを用いることができる。MuL結合パートナーに関して上記で記載した通り、MuLのための第2結合パートナーはMuLに特異的な抗体、MuLに共役したハプテンに特異的な抗体、ビオチンがMuLに共役している場合アビジン又はストレプトアビジン、MuLの融合パートナー蛋白質に結合する抗体などであることができる。

上記の第1又は第2結合パートナーが抗体である場合、検出はエンザイムイムノアッセイ (EIA) (Voller, A., *Diagnostic Horizons* **2**:1-7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller, A. *et al.*, *J. Clin. Pathol.* **31**:507-520 (1978); 米国特許第31,006号明細書; 英国特許第2,019,408号明細書; Butler, J. E., *Meth. Enzymol.* **73**:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980) 又はラジオイムノアッセイ (RIA) (Wienbraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assa

y Techniques, The Endocrine Society, March 1986, pp. 1-5, 46-49及び68-78) を含む従来の多様なイムノアッセイのいずれを用いても行うことができる。

好ましい態様の場合、MuL-特異的な抗体又は抗体フラグメントに、それを酵素に結合することにより検出可能な標識をし、EIA又は酵素-結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) で用いる。今度は後でこの酵素を、例えば分光光度測定、蛍光測定又は最も好ましくは視覚による手段で検出できる化学的部分を与えるような方法で酵素に基質を暴露する。基質は標識で見ることができる反応生成物を生成する色素基質であることが好ましい。

MuL-特異的な抗体などのミスマッチ-結合蛋白質のための結合パートナーに検出可能な標識をするために用いることができる酵素には、アルカリ性ホスファターゼ、ホスラディッシュパーオキシダーゼ、グルコース-6-ホスファートデヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスノクレアーゼ、デルター-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロホスファートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスファートイソメラーゼ、アスパラギナーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスファートデヒドロゲナーゼ、グルコamilラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

結合パートナー、例えばMuL-特異的な抗体を放射線標識することにより、ラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて固体媒体に結合したMuLを検出することができる。放射線同位体は、ガンマカウンター

又はシンチレーションカウンターを用いるなどの方法で、あるいはオートラジオグラフィーにより検出することができる。本発明の目的に特に有用な同位体は: ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、及び好ましくは ^{125}I である。

第1又は第2結合パートナーを蛍光化合物で標識することもできる。蛍光標識した抗体を通した波長の光に暴露すると、その存在を蛍光により検出することができる。最も普通に用いられる蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オ-フタルアルデヒド及びフルオレサミンがある。

第1又は第2結合パートナーは、それを化学発光化合物にカップリングさせることにより検出可能な標識をすることもできる。その後化学発光-付加抗体の存在を、化学反応の経路で生ずる化学発光の存在を検出することにより決定する。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマチック (theromatic) アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びオキサレートエステルである。

同様に、生物発光化合物も第1又は第2結合パートナーの標識に用いることができる。生物発光は、生物系で見られる種類の化学発光であり、その場合熱感蛋白質が化学発光反応の効率を増加させる。生物発光蛋白質の存在は発光の存在の検出により決定される。標識の目的に重要な生物発光化合物はルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエウオリンである。

検定すべき試験材料はいずれの問題の媒体中にあることもでき、一般に医学的、獣医学的、環境的、栄養的、又は工業的に重要な材料であ

瘦——瘦身

[illegible]

統一統治

[illegible]

表 1-12

[illegible]

本発明は、上記の方法の實行に有用なキット又は試薬系も目的としている。そのようなキットは本明細書に開示されている方法に従う検定を行うのに必要な必須の成分から成る試薬の組み合わせを含む。試薬系は商業的に包装された形態で、試薬の相溶性が許せば組成物又は混合物として、試験装置の形状で、あるいはより典型的に試験キットとして、すなわち試薬を入れた1個又はそれより多い容器、装置などを組み合わせ、通常検定を行うために書かれた指示を含んで包装して与えられる。本発明のキットは本明細書に記載の種々の検定型式を行うためのいずれの形状及び組成物を含むこともできる。

すべての場合に試薬系は(1)本明細書に記載の固定可能な、又は固定されたハイブリッド形成パートナー、及び(2)ミスマッチー結合蛋白質又は機能性誘導体を含む。ミスマッチー結合蛋白質は場合により検出可能な標識をされていることができる。キットは場合によりミスマッチー結合蛋白質のための第1結合パートナー、例えば抗-Mu t S抗体、Mu t L蛋白質又は機能性誘導体、及び追加の結合パートナー又は検出可能な標識をした試薬を含むことができる。本発明のキットはさらに補助化学品、例えばハイブリッド形成溶媒の成分、試験試料中の2本鎖核酸を1本鎖形態に変換することができる変性剤、又は試料核酸のフラグメントを形成するための制限酵素を含むことができる。

ここで本発明を一般的に記載してきたが、以下の実施例を参照することにより本発明をさらに容易に理解することができるであろう。実施例は例として示すものであり、本発明を制限するものではない。

实施例 1

突然変異DNA配列に関する血液からの試料の検定

検定型式は図3に一般的に記述されている。試料DNAは、1個の塩基対により、又は1個あるいは数個の塩基対の付加又は欠失により野生型と異なる特定の突然変異の存在に関して調べる血液細胞から得る。その後DNAを定性し、その時点で検定の準備ができる。

約30ヌクレオチドの試験DNAハイブリッド形成パートナーを、同様の突然変異の付近の野生型遺伝子配列に対応する配列を有するように構築する。ミスマッチに関する正の標準として、健状赤血球ヘモグロビンの点突然変異を用いる。突然変異配列を有するオリゴヌクレオチド（エクソン10）を製造する。検定のための負の標準として、野生型配列のものであることが既知のオリゴヌクレオチド、エクソン10の野生型ヒトヘモグロビン配列を製造する。

ハイブリッド形成パートナーDNAをニトロセルロースフィルター上に以下の要領で固定する：

- (a) “プラス”の印の位置線の形態の試験ハイブリッド形成パートナーDNA。
- (b) 正の標準のDNAを同一の“プラス”の印の水平線の形態でフィルター上に固定する。
- (c) 負の標準のDNAを“プラス”の印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理してオリゴヌクレオチドを固定し、従来の方法を用いてすべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ（Sambrook *et al.*, 同上）。

試料DNAを10-100 μ g/mlの濃度で加え、0.1-0.3 M NaCl中の45-55℃でハイブリッド形成反応を行い、3個の

し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こり、水平線が見える。この試料からのDNAは陽的DNA配列中に点突然変異を有するので、“プラスの印”の位置線が着色反応生成物を与える。

実施例11

Mu1 L結合パートナーを用いた突然変異DNA配列に関する検定
一般的検定型式は、実施例1の記載と同様である。試料DNAは1個の塩基対により、又は1個あるいは数個の塩基対の付加又は欠失により野生型と異なる特定の突然変異の存在に関して調べる血液細胞から得る。その後DNAを定性し、その時点で検定の準備ができる。

約30ヌクレオチドの試験DNAハイブリッド形成パートナーを、同様の突然変異の付近の野生型遺伝子配列に対応する配列を有するように構築する。ミスマッチに関する正の標準として、健状赤血球ヘモグロビンの点突然変異を用いる。突然変異配列を有するオリゴヌクレオチド（エクソン10）を製造する。検定のための負の標準として、野生型配列のものであることが既知のオリゴヌクレオチド、エクソン10の野生型ヒトヘモグロビン配列を製造する。

ハイブリッド形成パートナーDNAをニトロセルロースフィルター上に以下の要領で固定する：

- (a) “プラス”の印の位置線の形態の試験ハイブリッド形成パートナーDNA。
- (b) 正の標準のDNAを同一の“プラス”の印の水平線の形態でフィルター上に固定する。
- (c) 負の標準のDNAを“プラス”の印の近辺の点の形態でフィルタ

オリゴヌクレオチドフラグメントへの適した制限フラグメントの結合を促す。

フィルターを洗浄し、Mu1 Sをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナル ウサギ抗-Mu1 S抗体をフィルターに加えて結合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後ホースラディッシュペーオキシダーゼ共役ヒツジ抗-ウサギ免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュペーオキシダーゼに関する色原基質を加え、着色線（又はプラスの印）が現れるまで発色反応を展開させ、線が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう：

A. DNA中に点突然変異がない試料の場合（陰性）：

- (1) 点（負の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。
- (2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こる。
- (3) かくして着色“マイナス”の印がフィルター上に現れ、試料中の突然変異DNAに関する試験において陰性の結果を示す。

B. DNA中に点突然変異を有する試料の場合（陽性）：

- (1) 点（負の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。
- (2) “プラスの印”が見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有

ーに適用する。

フィルターを処理してオリゴヌクレオチドを固定し、従来の方法を用いてすべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ（Sambrook *et al.*, 同上）。

試料DNAを10-100 μ g/mlの濃度で加え、0.1-0.3 M NaCl中の45-55℃でハイブリッド形成反応を行い、3個のオリゴヌクレオチドフラグメントへの適した制限フラグメントの結合を促す。

フィルターを洗浄し、Mu1 Sをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

Mu1 L- β -ガラクトシダーゼ融合蛋白質を第1結合パートナーとして加え、結合させ、非結合材料を洗い流す。

第2結合パートナー、ポリクローナルウサギ抗- β -ガラクトシダーゼ抗体をフィルターに加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後第3結合パートナー、ホースラディッシュペーオキシダーゼ共役ヒツジ抗-ウサギ免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュペーオキシダーゼに関する色原基質を加え、着色線（又はプラスの印）が現れるまで発色反応を展開させ、線が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう：

A. DNA中に点突然変異がない試料の場合（陰性）：

- (1) 点（負の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こる。

(3) かくして着色“マイナス”の印がフィルター上に現れ、試料中の突然変異DNAに関する試験において陰性の結果を示す。

B. DNA中に点突然変異を有する試料の場合(陰性):

(1) 点(魚の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) “プラスの印”が見える。この試料からのDNAは陽的DNA配列中に点突然変異を有するので、“プラスの印”の垂直線が着色反応生成物を与える。

実施例III

腫瘍組織中の突然変異p53発癌遺伝子の検出

p53遺伝子は腫瘍抑制遺伝子であると思われ(Levine, A. et al., *Nature* 351:453-455 (1991))。その中の多くの部位における突然変異が腫瘍、特に大腸肛門癌(colorectal carcinoma)の発現を生ずる。例えばKinzler, K. W. et al., *Science* 251:1366-1370 (1991); Kern, S. E. et al., *Oncogene* 6:131-136 (1991); Vogelstein, B., *Nature* 348:681-682 (1990); Baker, S. J. et al., *Science* 249:912-915 (1990)も参照せよ。

腫瘍組織からヒトDNAを単離する。単離されたDNAを標準的条件

下で剪断する。その後DNAを変性し、その時点で検定の準備ができる。

標準的方法でp53遺伝子に対応するcDNA分子を製造し(Sambrook et al., 同上)、ハイブリッド形成パートナーとする。最知の突然変異が内在する領域はp53配列全体に分散されている。

ハイブリッド形成パートナーDNAを以下のようにしてニトロセルロースフィルター上に固定する(図3を参照):

(a) “プラス”の印の垂直線の形態の試験ハイブリッド形成パートナー(p53cDNA)をスポットする。

(b) 正の標準のDNAを同一の“プラス”の印の水平線の形態でフィルター上に固定する。

(c) 負の標準のDNAを“プラス”の印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理してハイブリッド形成パートナー ポリー又はオリゴヌクレオチドを固定し、従来の方法を用いてすべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ。

試料DNAを反応物に加え、ハイブリッド形成温度が55-80℃であること以外は(上記の通りの)ハイブリッド形成条件下でインキュベートし、3個のハイブリッド形成パートナー ポリー又はオリゴヌクレオチドフラグメントへの適したDNAフラグメントの結合を促す。

フィルターを洗浄し、Mu1Sをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナルウサギ抗-Mu1S抗体をフィルターに加えて結合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後ホースラディッシュペーオキシダーゼ共役ヒツジ抗-ウサギ

免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュペーオキシダーゼに関する色原基質を加え、着色“マイナス”又は“プラス”の印が現れるまで発色反応を展開させ、印が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう:

A. 突然変異p53発癌遺伝子がない試料の場合:

(1) 点(魚の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正の標準のDNAに相補的な非突然変異配列を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こる。

(3) かくして着色“マイナス”の印がフィルター上に現れ、試料DNAの突然変異p53発癌遺伝子に関する試験において陰性の結果を示す。

B. 突然変異p53発癌遺伝子を有する試料の場合:

(1) 点(魚の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) “プラスの印”が見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こり、水平線が見える。この試料からのDNAは陽的DNA配列中に少なくとも1個の点突然変異を有するので、“プラスの印”の垂直線が着色反応生成物を与える。

実施例IV

突然変異p53発癌遺伝子の発現の検出

ヒトmRNAを従来の方法により腫瘍組織から単離する(Sambrook et al., 同上を参照)。

標準的方法でp53遺伝子に対応するcDNA分子を製造し(Sambrook et al., 同上)、ハイブリッド形成パートナーとする。検定型は、図3に一般的に記載されている。

ハイブリッド形成パートナーDNAを以下のようにしてニトロセルロースフィルター上に固定する:

(a) “プラス”の印の垂直線の形態の試験ハイブリッド形成パートナー(p53cDNA)をスポットする。

(b) 正の標準のDNAは、腫瘍組織中で発現されることが知られており、改変された塩基を1個有する遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドを含む。このDNAを同一の“プラス”の印の水平線の形態でフィルター上に固定する。

(c) 正の標準として用いたオリゴヌクレオチドの野生型配列を含む負の標準のDNAを“プラス”の印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理してハイブリッド形成パートナー ポリー又はオリゴヌクレオチドを固定し、すべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ。

試料mRNAを加え、反応物をハイブリッド形成条件下でインキュベートし、3個のハイブリッド形成パートナー ポリー又はオリゴヌクレオチドへのmRNAの結合を促す。

フィルターを洗浄し、Mu1Sをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナル ウサギ抗-Mu1S抗体をフィルターに加えて結合

させ、非結合抗体を洗い流す。

その後ホースラディッシュペーオキシダーゼ-共役ヒツジ抗-ウサギ免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュペーオキシダーゼに関する色素基質を加え、着色“マイナス”又は“プラス”の印が現れるまで発色反応を継続させ、印が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように表れるであろう：

A. 野生型p53遺伝子を発現する試料の場合：

(1) 点（魚の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) 水平線のみが見える。従って着色“マイナス”の印がフィルター上に現れ、試料mRNA中の突然変異p53発現遺伝子の発現に関する試験における陰性の結果を示す。

B. 突然変異p53遺伝子を発現する試料の場合：

(1) 点（魚の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) “プラスの印”が見える。患者はおそらく正の標準のDNAに相補的な非突然変異配列を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こり、水平線が見える。この試料からのmRNAは陽的配列中に少なくとも1個の点突然変異を有するので、“プラスの印”の濃度線が着色反応生成物を与える。

実験例V

mutS蛋白質によるミスマッチ検出

切断液B（20mMのKPO₄、pH7.4、0.1mMのEDTA、1mMのPMSF、10mMの2-メルカプトエタノール）中で1:10に希釈し、直後に1.5×30cmのHeparin-Sepharose CL6B（Pharmacia）カラムに2ml/分に適用した。カラムを0.1MのKClを含む100mlの切断液Bで洗浄し、切断液B中のKClの濃度勾配（0.1-0.5M）を300ml用いて溶離した。100個の3ml留分を集めた。試料を還元条件下で4-20%のSDS-PAGEゲル上で移動させ、>95%のmutS蛋白質（97kDa）を含む留分をプールした。プールした物質に20%の最終濃度までグリセロールを加え、アリコートをして-70℃で保存した。

オリゴヌクレオチド。 Biopolymer Labsからオリゴヌクレオチドを得た。オリゴヌクレオチドの配列は、ヒトβ-グロブリン遺伝子中の鎖状赤血球突然変異の部位の周りの30塩基からとった。オリゴヌクレオチドをニトロセルロースフィルターに固定するために、5' 25merポリ-C “尾部”及び5' アミノ修飾基を有する選ばれたオリゴヌクレオチドを調製した。これらの実験で用いた配列を表2に示す。（記：実際の鎖状赤血球突然変異はA:T→T:Aトランスバージョンである。）オリゴヌクレオチドを種々の組み合わせでアニーリングし、G:T、A:C及びG:Cミスマッチ、（野生型配列を有するオリゴヌクレオチドを1個の塩基の付加又は欠失突然変異を有するオリゴヌクレオチドにアニーリングした場合に形成されるような）1個の不對塩基を有するヘテロ2本鎖、及び2個の異なるホモ2本鎖、すなわち完全に相補的な2本鎖を形成した。アニーリング条件は下記に記載する。

抗-mutS抗体。 ポリクローナル抗-mutS抗体は、ニュージ-

材料及び方法

菌種。 mutS発現プラスミドpMS312（Su and Modrich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5057, 1986）の導入により1.2L（ラムダ c1857 N1 ΔH kil⁻）をmutS過剰生産菌株とした。

mutSの精製。 mutS精製は、Su及びModrich（同上）により記載された方法の修正法である。1.2L（pMS312）細胞を50μg/mlのアンピシリンを含む8リットルの869培地（10g/lのBacto-Trypton（Difco）、5g/lの酵母抽出物（Difco）、5g/lのNaCl）中の30℃にてOD₆₀₀ = 1.3-1.8まで育成した。培養物を60℃に予備加熱した869培地中で1:2に希釈し、42℃で5時間インキュベートした。培養物を冷却し、遠心により細胞を収穫し、細胞ペーストを-70℃で保存した。細胞ペースト（15-29グラム）を氷上で解凍し、細胞を等体積の緩衝液A（20mMのKPO₄、pH7.4、1mMのEDTA、1mMのPMSF、10mMの2-メルカプトエタノール）に再懸濁した。細胞をホーアセトン溶液中の雷波処理によりライシスした。ライセートを遠心により透明とした（40,000g:30分）。上澄み液を緩衝液A中の25%（w/v）のストレプトマイシンサルフェート1/4体積で処理し、4℃で45分間攪拌した。不溶性物質を遠心により除去した（40,000g:30分）。硫酸アンモニウム（上澄み液1ml当たり0.2g）を15分間かけて加え、懸濁液を4℃にてさらに40分間攪拌した。遠心により沈殿を集め（40,000g:30分）、10mlの緩衝液Aに再懸濁した。1mlの留分を0.025MのKClを含む

ランド白ウサギ（Pel Freez）に精製mutS蛋白質を注射することにより得た血清から調製した。蛋白質G-セファロース（Pharmacia）カラムクロマトグラフィーにより抗体を部分的に精製した。ドットプロット分析において、10μg/mlの抗-mutS抗体は1ngの精製mutS蛋白質を検出することが見いだされた。

結果

溶液中でアニーリングされたヘテロ2本鎖中のミスマッチの検出

図4に示されているデータは、G:T及びG:C含有ヘテロ2本鎖がmutS蛋白質により検出されることを示す。検出はmutSに依存しており、ヘテロ2本鎖DNAと競争することができるがホモ2本鎖DNAと競争しない。A:Cミスマッチ及び1個の不對塩基を有するヘテロ2本鎖の場合にも同様の結果が得られた（データは示さない）。

固定オリゴヌクレオチドへのアニーリング

“テイリングされた（tailed）”オリゴヌクレオチドをフィルター上にスポットし、30merのオリゴヌクレオチドをそれにアニーリングした。結果（図5）は溶液中でアニーリングすることにより調製したヘテロ2本鎖の場合に得た結果（図4）と同一である。ホモ2本鎖（固定オリゴヌクレオチドの30mer部分と正確に相補的な30merオリゴヌクレオチドを用いて形成した）は検出されなかった。

競争オリゴヌクレオチドの存在下のアニーリング

相補的30merをアニーリングすることによりホモ2本鎖を調製した。その後“テイリングされた”オリゴヌクレオチドを加え、ホモ2本鎖を酸性し、混合物を再アニーリングした。試料をフィルター上にスポットした。図6はそのような条件下でG:Tミスマッチが検出される

ことを示し、“テイリングされた”オリゴヌクレオチドが特異的オリゴヌクレオチドに關して30mersと有効に競争することを示している。そのような条件は、突然変異検出法で用いられる条件と一致している。そのような検定では、試料DNAは制限酵素により切断されるか(ゲノムDNAの場合)、又はPCRにより複製される。いずれの場合もDNAは2本鎖であり、従ってプローブとして用いられるテイリングされたオリゴヌクレオチドと同一でそれと競争することができる配列を含んでいる。

図4に示されている結果は以下の要領で行われた実験から得た：

等量のオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによりヘテロ2本鎖及びホモ2本鎖を調製した。“テイリングされた”オリゴヌクレオチドは55塩基長なのでほとんど2倍過剰の30mersがあり、すべての“テイリングされた”オリゴヌクレオチドが2本鎖となる傾向が増加する。TNE(10mMのトリス、pH8.0、0.1MのNaCl、1mMのEDTA)中の5 μ g(50 μ l)のそれぞれのオリゴヌクレオチドを混合し、70℃に10分間加熱し、30分間室温に冷却し、氷上で冷却した。アニーリングされた分子(2 μ l中1 μ l)を25mmのニトロセルロース膜板(孔径0.45ミクロン、Schleicher and Schuell)上にスポットした。第1(抗-mutS)及び第2抗体ならびにアルカリ性ホスファターゼ染色のための正の標準として10ngの精製mutSをフィルター上にスポットした。フィルターを空気乾燥し、2mlの反応緩衝液(20mMのトリス、pH7.4、0.01mMのEDTA、0.5mMのMgCl₂、0.01mMのDTT)及び3%(w/v)無脂肪乾燥乳を含む6 μ lの組織培養

液(Falcon)に移し、覆やかに振りながら4℃で終夜インキュベートした。フィルターを冷反応緩衝液(4x2ml)で洗浄し、1本鎖結合蛋白質(Promega)溶液(反応緩衝液中100 μ g/mlにて1ml)と共にインキュベートした(4℃で30分間)。フィルターを冷反応緩衝液(4x2ml)で洗浄し、(i)1mlの反応緩衝液、(ii)1mlの反応緩衝液及び10 μ g/mlのmutS、又は(iii)1mlの反応緩衝液及び10 μ g/mlのmutS及び1 μ g/mlの上記の通りにアニーリングしたホモ2本鎖又はヘテロ2本鎖30mersと共にインキュベートした(4℃で30分間)。フィルターを冷反応緩衝液(4x2ml)で洗浄し、抗-mutS抗体(反応緩衝液及び3%の無脂肪乾燥乳中50 μ g/mlにて2ml)と共にインキュベートした(4℃で2時間)。フィルターを冷反応緩衝液(4x2ml)で洗浄し、アルカリ性ホスファターゼに共役させたヒツジ抗-ウサギIgG(Bio-Rad)の1:1000希釈(反応緩衝液及び3%の無脂肪乾燥乳中)2mlと共にインキュベートした(4℃で1時間)。フィルターを冷反応緩衝液(4x2ml)で洗浄し、2mlの新しい固定緩衝液(100mMのトリス、pH9.5、100mMのNaCl、5mMのMgCl₂、0.165mg/mlのプロモクロロインドールホスフェート(ジメチルホルムアミド中の保存溶液から1:100に希釈)、0.33mg/mlのニトロブルー-テトラゾリウム(ジメチルホルムアミド中の保存溶液から1:100に希釈))と共にインキュベートした(室温で10-20分間)。フィルターを水で数回洗浄し、反応を止めた。

図5に示されている結果は、以下の要領で行われた実験から得た：

*-5'アミノ修飾基

1-ポリC尾部及び5'アミノ修飾基なしでも調製

表2への凡例

オリゴヌクレオチドアニーリング	配列番号
1+3=G:Tミスマッチ	1) SEQ ID #1
1+4=G:Gミスマッチ	2) SEQ ID #2
1+5=ホモ2本鎖	3) SEQ ID #3
1+6=付加/欠失ヘテロ2本鎖	4) SEQ ID #4
2+3=ホモ2本鎖	5) SEQ ID #5
2+5=A:Cミスマッチ	6) SEQ ID #6

同等例

ここで本発明を完全に記載したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、及び不必要な実験を行うことなく同等のパラメーター、濃度及び条件の広い範囲内で同一のことが行えることは、当該技術分野における熟練者にわかるであろう。

本発明をその特定の態様に關連して記載してきたが、さらに修正が可能であることは理解されるであろう。本出願は、一般に本発明の原理に従い、本発明に關連する技術内で既知の又は通常行われる実行に含まれ、添付請求の範囲内に示す通り前記に示されている必須の特徴に適用することができる本開示からのずれを含むいづれの変更、利用又は適用も含むものとする。

1 μ g(2 μ l)の“テイリングされた”オリゴヌクレオチドをニトロセルロースフィルター上にスポットした。フィルターを空気乾燥し、2mlのTNEを含む6 μ lのウェル板に移した。2 μ g(4 μ l)の30merオリゴヌクレオチドを加えた。板を70℃の水浴中に10分間浸かせ、室温で30分間インキュベートし、氷上に置いた。その後フィルターを、図4に示す結果と關連して上記に記載した通りに処理した。

図6に示されている結果は、以下の要領で行われた実験から得た：

等量の30merオリゴヌクレオチドを図4に対する説明中に記載の通りにアニーリングした。等量の“テイリングされた”オリゴヌクレオチドを加え、混合物を85℃に10分間加熱し、その後室温で30分間インキュベートした。その後の段階はすべて図4に対する説明中に記載の通りである。

アニーリングを容易にするために、1本鎖DNA結合蛋白質の代わりにrecA蛋白質を用いることができることを指摘しなければならない。

表 2

オリゴヌクレオチド配列

1) *ccc...ccGCACCTGACTCTCTGGGAGAGCTCTGCCGT	突然変異体 ¹
2) *ccc...ccGCACCTGACTCTCTGAGGAGAGCTCTGCCGT	野生型
3) CGTGGACTGAGGACTCTCTTCAGACGGCA	野生型
4) CGTGGACTGAGGAGCGCTCTTCAGACGGCA	突然変異体
5) CGTGGACTGAGGAGCCCTCTTCAGACGGCA	突然変異体
6) CGTGGACTGAGGAGCCCTCTTCAGACGGCA	突然変異体

(+1 塩基)

配列番号: 1

配列の長さ: 35

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

配列

CCCCCGCACC TGACTCCTGC GGAGAACTCT
GCCGT

配列番号: 2

配列の長さ: 35

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

配列

CCCCCGCACC TGACTCCTGA GGAGAACTCT
GCCGT

配列番号: 3

配列の長さ: 30

配列

CGTGGACTGA GGACCCCTCT TCAGACGGCA

配列番号: 6

配列の長さ: 31

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

配列

CGTGGACTGA GGACCCCTC TTCAGACGGC
A

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

配列

CGTGGACTGA GGACTCCTCT TCAGACGGCA

配列番号: 4

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

配列

CGTGGACTGA GGACGCCTCT TCAGACGGCA

配列番号: 5

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

突然変異の存在に関して調べるべきDNAハイブリットの略図

(a) オリゴヌクレオチド

(b) c-DNA

試験DNA (ゲノムフラグメント)

変性及びアニーリング

(a)

(b)

ミスマッチ含有DNAハイブリットの略図

(a) オリゴヌクレオチド

(b) c-DNA

FIG. 1

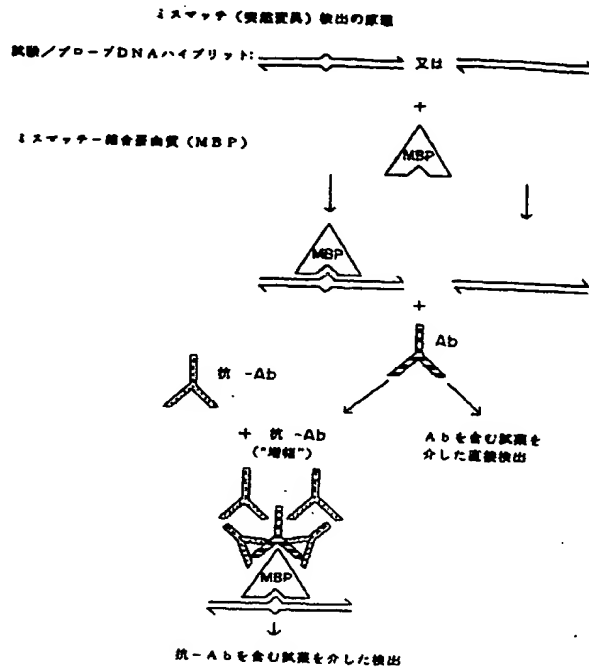


FIG. 2

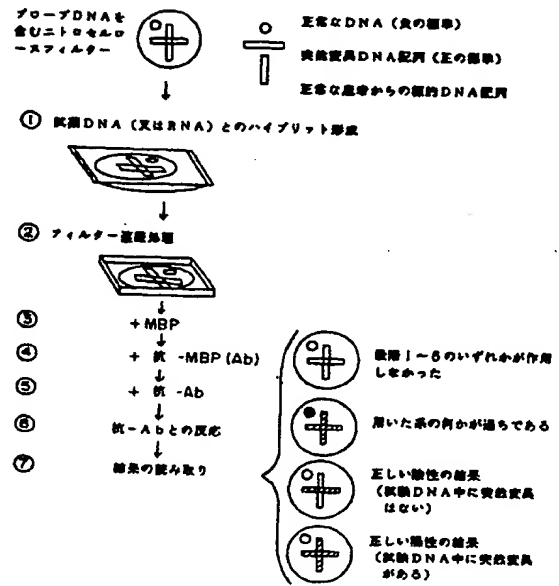


FIG. 3

FIG. 4A

G-T

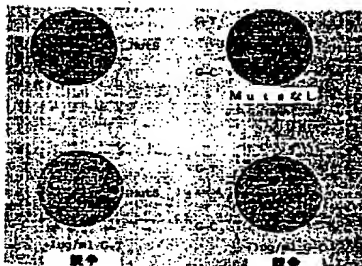


FIG. 4B

G-G

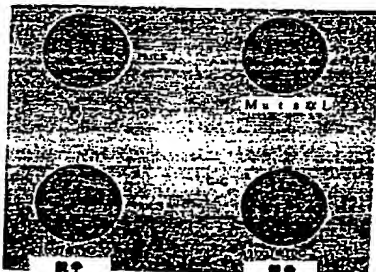


FIG. 5

G-T

G-G

A-C

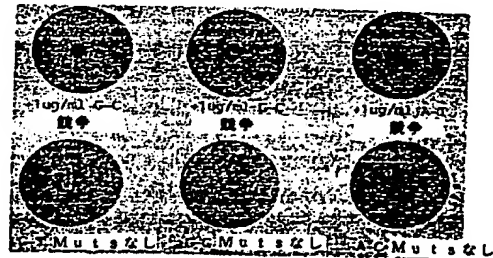
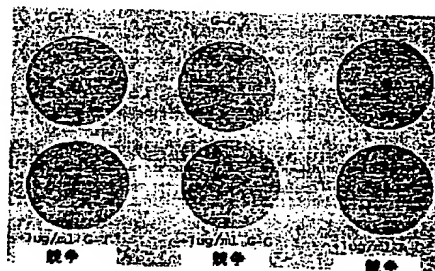
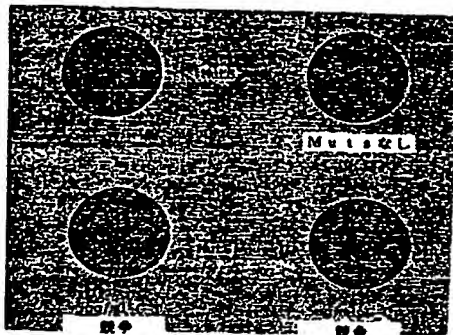


FIG. 6



CLASSIFICATION OF RELATED PATENTS	
Int.Cl. 5 C12Q/00	
IN PHASE OF ARTWORK	
Characterization Group	
Int.Cl. 5	C12Q
Documents considered to be relevant	
Company	Country of Origin, or other appropriate, of the molecule identified
Y	GP, A. 2 179 725 (LIFECODES CORPORATION) 11 March 1987 see page 3, line 8 - line 82: claims
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 16, no. 18, 1988, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 7803 - 7833 J. JERICNY ET AL. 'Mismatch-containing oligonucleotide duplexes bound by the E. coli mutS-encoded protein' cited in the application see the whole document, especially the abstract
1-5	
1-5	
IV. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Issuance of the International Search Report
11 NOVEMBER 1992	21.12.92
International Searching Authority	Examiner of the International Search Report
EUROPEAN PATENT OFFICE	LUZZATTO E.R.

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Company	Country of Origin, or other appropriate, of the molecule identified
A	EP, A. 0 310 251 (MOLECULAR DEVICES CORPORATION) 5 April 1989 cited in the application see page 2, line 40 - line 52: claims
1,6-12	

This report lists the patent family members related to the present document cited by the above-mentioned International Search Report. The numbers are as mentioned in the Company Patent Office (CPO) file. The European Patent Office is in no way liable for their presentation which are merely given for the purpose of information. 11/11/92

Patent Document Number in company report	Publication date	Patent Family Member	Publication date
GB-A-2179735	11-03-87	US-A- 4784075	27-12-88
		DE-A- 905348	02-03-87
		DE-A- 3429180	06-03-87
		FR-A, B 2586705	06-03-87
		JP-A- 62158499	14-07-87
EP-A-0310251	05-04-89	US-A- 4978608	18-12-90
		JP-A- 2017000	19-01-90
		US-A- 4963658	16-10-90
		US-A- 5011770	30-04-91